



Title	膵癌の間質における癌関連線維芽細胞マーカーの発現状況と臨床病理学的因子の関連に関する研究
Author(s)	佐藤, 大介
Description	配架番号 : 2349
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(医学)
Dissertation Number	甲第12935号
Issue Date	2017-12-25
DOI	https://doi.org/10.14943/doctoral.k12935
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/68569
Type	doctoral thesis
File Information	Daisuke_Sato.pdf



学 位 論 文

膵癌の間質における癌関連線維芽細胞マーカーの発現状況と

臨床病理学的因子の関連に関する研究

(Studies on relationship between stromal expression
of cancer associated fibroblast markers and
clinicopathological features of pancreatic cancer)

2017 年 12 月

北 海 道 大 学

佐 藤 大 介

学 位 論 文

膵癌の間質における癌関連線維芽細胞マーカーの発現状況と

臨床病理学的因子の関連に関する研究

(Studies on relationship between stromal expression
of cancer associated fibroblast markers and
clinicopathological features of pancreatic cancer)

2017 年 12 月

北 海 道 大 学

佐 藤 大 介

目 次

発表論文目録および学会発表目録	1 頁
緒言	2 頁
略語表	5 頁
方法	6 頁
結果	11 頁
考察	22 頁
総括および結論	26 頁
謝辞	27 頁
引用文献	28 頁

発表論文目録および学会発表目録

本研究の一部は以下の論文に発表した。

1. Daisuke Sato, Takahiro Tsuchikawa, Tomoko Mitsunashi, Yutaka Hatanaka, Katsuji Marukawa, Asami Morooka, Toru Nakamura, Toshiaki Shichinohe, Yoshihiro Matsuno, Satoshi Hirano

Stromal Palladin Expression Is an Independent Prognostic Factor in Pancreatic Ductal Adenocarcinoma

PLoS One, 11(3):e0152523. doi: 10.1371/journal.pone.0152523, 2016.

本研究の一部は以下の学会に発表した。

2. Daisuke Sato, Tomoko Mitsunashi, Takahiro Tsuchikawa, Yutaka Hatanaka, Toru Nakamura, Satoshi Hirano, Yoshihiro Matsuno

Stromal Palladin Expression Is An Independent Prognostic Factor of Pancreatic Ductal Adenocarcinoma (PDAC).

2015 United States & Canadian Academy of Pathology Annual Meeting, March 21-27, 2015, Boston, Massachusetts, United States.

3. 佐藤大介 土川貴裕 三橋智子 畑中豊 野路武寛 倉島庸 海老原祐磨 村上壮一
中村透 田本英司 岡村圭祐 七戸俊明 松野吉宏 平野聡

膵癌局所環境における CAF マーカー-palladin の発現は独立した予後因子である

第 27 回肝胆膵外科学会・学術集会, 2015 年 6 月 11-13 日, 東京.

【緒言】

膵管腺癌、いわゆる膵癌は膵管上皮に由来する悪性腫瘍である。2016 年米国では新規患者 53,070 人に対して死亡 41,780 人と推定され、2030 年には癌死亡の第 2 位をしめると予想されるなど、消化器癌の中でも最も予後不良な疾患の一つである^{1, 2}。根治を望める唯一の治療法は手術による切除であるが、手術手技・診断法など各種技術の目覚ましい進歩にもかかわらず切除率は 40%前後に留まり、満足のいく治療成績が得られているとは言い難い^{3, 4}。

しかし、現在化学療法を中心とする集学的治療法が大きく発展しつつあり、膵癌の予後も改善の兆しがみられている。1990 年代の切除不能症例に対する GEM (gemcitabine) 投与の確立を皮切りに⁵、S-1^{*}(テガフル、ギメラシル、オテラシルカリウム合剤)の有効性が証明され^{6, 7}、近年では FOLFIRINOX(イリノテカン、オキサリプラチン、レボホリナートカルシウム併用療法)や GEM+ナブパクリタキセルなど多剤併用レジメンの開発などにより化学療法の選択肢は広がり^{8, 9}、また 2000 年代以降術後補助化学療法の有用性が確立される^{7, 10, 11}など、治療成績向上に向けて化学療法が果たす役割は大きくなってきている。さらに、いわゆる borderline、切除可能境界症例を中心として腫瘍縮小や down staging、切除の際の断端陰性化・根治切除率の向上などによる治療成績の改善を期待した術前補助化学療法も臨床研究が盛んに行われ¹²⁻¹⁴、当初切除不能と診断された症例に対しても化学療法施行後に切除可能と判断されれば外科手術を付加する conversion surgery の取り組みも一部で行われる¹⁵など、膵癌に対する化学療法後の外科切除は年々増加している。

手術に先行する化学療法が普及するなかで、その有効性に関するデータの集積も増加しているが¹²⁻¹⁴、治療選択における課題もある。まず、術前治療において一定数の化学療法不応群が存在し、逆に病勢の進行により切除時期を逸する症例が存在する可能性があげられ、化学療法施行前・施行中に効果予測を可能とする因子の同定が求められている。また、化学療法が奏功し切除に至った症例群に関しても、得られた検体の病理学的診断の評価はいまだ確立されていない。すなわち、膵癌切除症例における進行度評価や予後予測には切除検体の組織学的な検索が唯一の手段であるが、化学療法後の切除検体では腫瘍細胞の変性・崩壊、組織球浸潤、線維間質の拡大や時に粘液湖の形成など様々な修飾が加わっており、組織学的な解釈が難しく、結果として、その後どのように経過観察すべきか、またどのような治療を継続していくべきかに関する明確な指針は定まっていないのが現実である。

これまで膵癌における化学療法後の病理学的な効果判定は、大星・下里分類(食道癌化学療法後効果判定)¹⁶をもとに 1989 年の Ishikawa らが初めて報告して以来¹⁷、複数の評価方法が提案されている。現在最も頻用されているのは Evans 分類であるが¹⁸、それらの判定基準はいずれも主に腫瘍細胞の変性所見に基づいており、腫瘍細胞密度が低いことが多い膵癌では正確性をもった評価がなされてきたとは言い難い。そのような中、2016 年に改訂された膵癌取り扱い規約の第 7 版では、初めて治療効果判定基準に関する記載がなされた。Evans 分類を踏襲した細胞変性所見を中心としつつ、線維間質増生などの所見も評価対象に加えるこ

とが記載された¹⁹。過去の報告でも線維間質の増生領域をもとの腫瘍浸潤範囲とみなし残存腫瘍細胞の占める割合を評価方法も提案されてきたが²⁰、しばしば随伴性膵炎による病変以上の線維化を伴う膵癌では、治療効果を過大に見積もる可能性があるため注意が必要である。その結果、過去の報告ではpathological CR (complete response: 完全寛解) などの限られた著効例を除き、既存の効果判定は必ずしも的確に患者予後を反映できていなかった^{21, 22}。

治療後膵癌検体の検索において、より臨床経過・予後を反映した評価を行うには間質の機能に着目する必要があると考え、本研究では膵癌間質の免疫組織化学的研究を計画した。治療後膵癌に豊富に認められる線維間質を定性的に判定することができるになれば、腫瘍随伴性線維化、膵炎に伴う線維化、治療瘢痕としての線維化を見分け、腫瘍消退範囲を正確に評価できる可能性があると考えたからである。

癌腫瘍は腫瘍細胞と周囲の間質から構成されるが、間質領域には線維芽細胞、炎症細胞、血管構成細胞など、多くの非腫瘍細胞と細胞外器質が含まれている。これら腫瘍細胞および各種間質細胞による腫瘍微小環境 (tumor micro environment; TME) が癌の進展に関連することが近年明らかになりつつある。中でも腫瘍細胞近隣の線維芽細胞は間質の多くを占める構成要素であり、非腫瘍組織中のそれとは異なる活性化状態と機能から、cancer associated fibroblast (CAF) と定義されている。CAF は sonic hedgehog、TGF- β 、TNF- α やインターロイキン 1、6 などの複数の経路を介して活性化し²³⁻²⁶、さまざまな分子マーカーを発現して癌細胞や他の間質構成細胞との相互作用により、腫瘍の発生・進展において必須な働きを担っており²⁷⁻³¹ (Figure 1)、またいくつかの癌種においては CAF マーカーの発現そのものの患者予後への関連も知られている³²⁻³⁴。CAF は複数の由来を持つ不均一な細胞集団であり³¹、その機能・性質も必ずしも単一ではないが、瘢痕組織における線維間質とは異なる特性を有していると思われる。

化学療法後膵癌組織、特に著効例では一見すると均一な瘢痕線維化が広がっているように見えるが、CAF と単純な瘢痕線維化が種々の程度にまじりあって分布していると考えられる。CAF をターゲットとした治療の試みは一部で行われているものの^{35, 36}、既存の化学療法治療後の CAF の状態に関してはこれまで十分に検討されていない。免疫組織化学染色の手法による CAF の観察で新たな知見が得られる可能性があると考えた。

CAF の免疫組織学的マーカーは α -SMA を始め多数知られているが、今回の検討では比較的新規性のあるマーカーであるアクチン結合タンパク palladin に着目した。palladin は膵癌 CAF において特異的に発現し³⁷、近年膵癌細胞の浸潤促進、腫瘍増大や転移に働くことが相次いで報告されている^{38, 39}。

本研究では、化学療法未施行、施行後の膵癌切除検体に対して palladin を中心とした CAF マーカーによる免疫組織学的発現解析、および CAF の発現と臨床病理学的因子との関連検討を行った。その結果、palladin の発現が化学療法未施行の膵癌において独立した予後因子となること、化学療法後には palladin の発現は減じること、化学療法後症例においても

palladin 発現の有無が予後を反映することを証明した。膵癌間質に関連した予後因子の解析はこれまで多く研究されておらず、今回の知見によって膵癌の予後をより多角的に評価できると考えられる。また、palladin の発現は化学療法後症例でも予後予測因子となり得ることから、今後は化学療法後の CAF 解析が新たな治療効果判定の確立につながる可能性も考えられる。

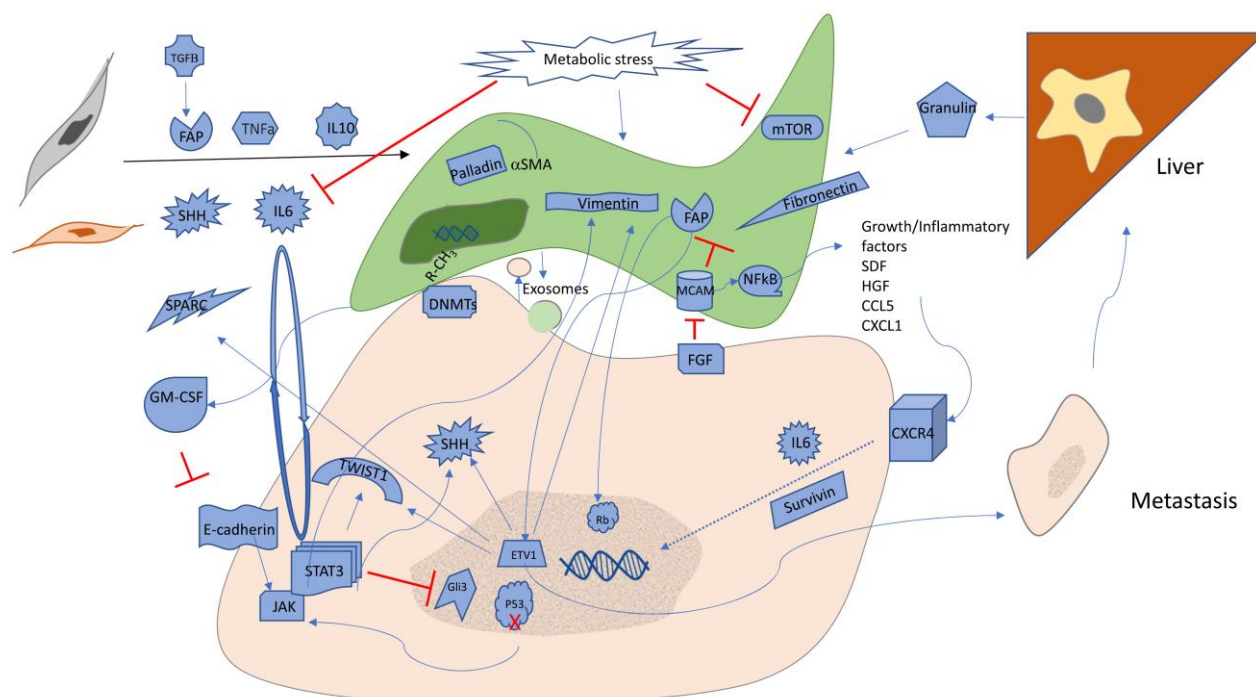


Figure 1. 間質の活性化と、腫瘍-間質細胞の相互作用

CAF (cancer associated fibroblast) の活性化は、複数の入り組んだ経路によることが報告されている。CAF は腫瘍細胞と様々な機構を介して緊密に相互作用しており、腫瘍の増大、浸潤、そして転移につながる。文献 31 より引用。

【略語表】

本文中および図中で使用した略語は以下の通りである。

α -SMA	α -smooth muscle actin
CAF	Cancer associated fibroblast
CAP	College of American Pathologist
CF	Chemotherapy first
CR	Complete response
DFS	Disease free survival
DSS	Disease specific survival
EUS-FNA	Endoscopic Ultrasound-Fine Needle Aspiration
GEM	Gemcitabine
HE	Hematoxylin and Eosin
SF	Surgery first
TMA	Tissue microarray
TME	Tumor micro environment
UICC	International Union Against Cancer

【方法】

今回の研究では、膵癌における間質の解析にあたって2つの検討を行った。第一の検討として術前未治療膵癌に対する免疫組織化学的解析を行い、主に間質領域を対象としてCAFマーカーの発現状況とCAFマーカー発現が持つ臨床病理学的な意義を分析した。その結果を踏まえ、第二の検討として術前治療後の膵癌症例と術前未治療の膵癌症例の主として間質の組織所見および免疫組織学的所見の比較を行い、治療によるCAFマーカー発現の変化を解析した。第一の検討では症例数が多数となるため、免疫組織化学染色の省力化と条件の均一化の目的でtissue microarray (TMA) の手法を採用した。第二の検討では、化学療法による組織所見の変化とCAFマーカー発現の変化を部位毎の差異も含めて詳細に観察するため、摘出検体のwhole sectionを対象として行った。

検討対象とした症例は2000年から2013年の間に北海道大学病院消化器外科Ⅱで切除が行われた膵癌患者で、患者記録・病理レポートから後方視的に術前未治療症例および治療後の切除症例にわけて検討した。全ての対象患者からは、文書により研究参加に関する同意を取得した（自主臨床試験番号013-0310）。全ての情報は患者が識別されないように匿名化して取り扱った。

1) 術前未治療膵癌患者検体

術前未治療症例に関する検討（第一の検討）では、167例の膵癌切除検体を対象とした。術後観察期間中央値は19ヶ月（2-148ヶ月）であった。各症例の組織標本に関して日本病理学会認定病理専門医1名がhematoxylin and eosin (HE) 染色スライドを鏡検し、診断の確認と代表的な組織領域の選定を行い、TMA作成部位を決定した。全ての症例はUICC (International Union Against Cancer) TNM分類第7版に従って病期分類し⁴⁰、TNM分類やその他の臨床病理学的因子を調査した (Table 1)。

Table 1. 167 症例の患者背景

		n (%), Median (range)
Gender	Male	98 (58.7%)
	Female	69 (41.3%)
Age, year		67 (43-89)
Tumor location	Head*	98 (58.7%)
	Body + tail	69 (41.3%)
Tumor size, cm		3.0 (1.0-8.1)
Histopathological grade	G1+2	145 (86.9%)
	G3	22 (13.1%)
Surgical margin	Positive	24 (13.4%)
	Negative	143 (86.6%)
pT	1+2	7 (4.2%)
	3+4	160 (95.8%)
Regional lymph node metastasis	Positive	117 (70.0%)
	Negative	50 (30.0%)
Distant metastasis	Positive	11 (6.6%)
	Negative	156 (93.4%)
Pathological stage	IA-IIA	47 (28.1%)
	IIB-IV	120 (71.9%)
Lymphatic invasion	Positive	138 (82.6%)
	Negative	29 (17.4%)
Vascular invasion	Positive	109 (65.3%)
	Negative	58 (34.7%)
Perineural invasion	Positive	147 (88.0%)
	Negative	20 (12.0%)
Adjuvant chemotherapy †	Positive	83 (50.0%)
	Negative	83 (50.0%)
Recurrent disease	Positive	125 (74.8%)
	Negative	42 (25.2%)
Local recurrence	Positive	29 (17.4%)
	Negative	138 (82.6%)

*; 腭頭部体部腫瘍 1 例、†; 1 例で術後化学療法の施行の有無が不明であった。

2) Tissue microarray (TMA) の作成

TMA の作成にあたっては、腫瘍部 2-4 か所（特に複数の組織型を含む場合はそれぞれの部位）、および腫瘍外の脾組織 3 か所からサンプリングを行った。TMA ブロックは、手動の tissue microarrayer (JF4; サクラファインテック日本、東京) を使用し、径 2.0mm 針で各検体のパラフィンブロックから選択した領域を円柱状に繰り抜き（コア）、あらかじめ同サイズの円柱状に穴をあけた別のパラフィンブロック内に整列させ作成した。TMA ブロックは、1 ブロックあたり 10~12 症例、コアの数は 53~61 であった。TMA パラフィンブロックは 5 μ m 厚に連続で薄切した。

3) 免疫組織化学染色

薄切した組織切片は、二つのキシレン槽にそれぞれ 5 分間順に浸し脱パラフィンし、100% エタノール、100%エタノール、95%エタノールの順にそれぞれ 3 分間ずつ通し、最後に 80% エタノール中でゆすぎ、再水和化したのちに水洗した。その後、pH 9.0 の溶液中で賦活化装置 (PT Link, DAKO) を用い加熱による抗原賦活化処理を行った（装置設定、約 70 分間）。続いて、5 分間 Dako peroxidase blocking solution に浸水し、内因性ペルオキシダーゼ反応をブロックした。最後に、Table 2 に記載した 3 つの CAF マーカーの一時抗体それぞれと 60 分室温で反応させ、ポリマー法 (En vision flex system for mouse monoclonal antibody and rabbit polyclonal antibody ; Dako) で可視化した。免疫組織化学染色後の切片はヘマトキシリンで対比染色し、エタノールで脱水したのちキシレンで洗浄した。

Table 2. 抗原の発現検索に用いた一次抗体

Marker	Source	Clone	Dilution	Antigen retrieval
palladin	Novus Biological	1E6	1:100	Tris-EDTA
α -SMA	Abcam	1A4	1:200	Tris-EDTA
podoplanin	Dako	D2-40	RTU	Tris-EDTA

Tris-EDTA, Tris-ethylenediaminetetraacetic acid-based solution;

α -SMA, α -smooth muscle actin.

4) 免疫組織化学染色評価法

免疫組織化学染色を施行した TMA 切片で、各コア毎に全間質領域において、各マーカーで染色されている面積の比率 (%) を計測した。症例毎に腫瘍部、非腫瘍部の複数のコアを個別に評価し、腫瘍部、非腫瘍部で最も染色比率が高いコアの値を、それぞれ当該症例の腫瘍

部、非腫瘍部のスコアとした。鏡検・面積の評価にあたっては日本病理学会認定病理専門医 1 名とともにいき、その際は臨床情報を伏せて行った。染色比率の陽性水準の設定においては、各マーカーに関してそれぞれ最初に 0～100%まで 10%刻みで cut off 値を定め、それぞれの値での陽性・陰性に対して Logrank 試験を行い患者の生命予後との関連を比較した。最終的に、palladin の評価においては、最もよく患者予後を反映した染色率 30%を cut off 値とした。一方、 α -SMA、podoplanin に関してはいずれの水準でも患者予後との関連を見出しがたかったため、palladin に倣い 30%を cut off 値に定めた。すなわち各マーカーそれぞれで cut off 値として定めた 30%以上の間質領域に染色性が認められた場合に陽性と定義した。

5) 統計解析

免疫組織化学評価と、生存情報を含むその他の臨床病理学的因子との関連を検討した。疾患特異的生存 (Disease specific survival; DSS) と無再発生存 (Disease free survival; DFS) は、それぞれ手術日から膀胱癌による死亡または再発確認日までの期間を計算した。2 変数間の検定は Fisher の正確検定、Wilcoxon 検定を適宜使用した。生存解析は Kaplan-Meier 法により生存曲線を求め、Logrank 試験で比較を行った。TMA 症例の無病生存期間解析においては、再発日に関する情報が欠損していた 2 症例を除外した。単変量解析で抽出された因子に対して、Cox 比例ハザードモデルによる多変量解析を行った。統計解析の際はいずれも $p < 0.05$ を有意水準とし信頼区間 95%とした。統計解析には JMP 11.0 for Windows (SAS institute. Inc., Cary, NC, USA) を使用した。

6) 化学療法未施行・施行後症例の免疫組織学的比較検討

化学療法未施行・施行症例の whole section を用いた比較解析 (第二の検討) には、術前未治療膀胱癌切除検体 (surgery first; SF 群と定義) 21 例と、術前治療後膀胱癌切除検体 (chemotherapy first; CF 群と定義) 19 例の合わせて 40 例を対象とした。

SF 群・CF 群の臨床病理学的因子を Table 3 に示す。CF 群では、Evans 分類¹⁸、college of American Pathologist (CAP) 分類 (2013)⁴¹ の双方で病理組織学的な治療効果を判定した。Evans 分類 Grade I-IIA、CAP 分類 Grade 2-3 を低治療効果、また、Evans 分類 grade IIB-IV、CAP 分類 grade 0-1 を高治療効果と定義した。免疫組織化学染色の手法は前項と同様に行い、その評価においては 200 倍視野で代表的な 3 視野を選択し、間質の染色比率の平均値が 30%以上の場合を陽性とした。統計解析に関しても前項と同様に施行したが、生存解析については初期治療の開始時から起算し生存日数を算出した。

Table 3. Whole section 解析を施行した化学療法未施行・施行後症例の患者背景

		SF group (n=21) n (%), Median (range)	CF group (n=19) n (%), Median (range)	<i>p</i> -value
Gender	Male	15 (71.5%)	7 (36.8%)	0.0550
	Female	6 (28.5%)	12 (63.2%)	
Age, year		66 (43–83)	65 (43–74)	0.3221
Tumor location	Head	10 (47.6%)	10 (52.6%)	1.000
	Body+tail	11 (52.4%)	9 (47.4%)	
Surgical margin	Positive	0	1 (5.3%)	0.4750
	Negative	21 (100%)	18 (94.7%)	
pT	0	—	3 (15.8%)	1.000
	1+2	1 (4.8%)	1 (5.3%)	
	3+4	20 (95.2%)	15 (78.9%)	
Regional lymph node metastasis	Positive	16 (76.2%)	8 (42.1%)	0.0515
	Negative	5 (23.8%)	11 (57.9%)	
Distant metastasis	Positive	0	0	N. A.
	Negative	21 (100%)	19 (100%)	
Pathological stage	0	—	3 (15.8%)	0.1514
	IA–IIA	4 (19.0%)	7 (36.8%)	
	IIB–IV	17 (81.0%)	9 (47.3%)	
Recurrent disease	Positive	16 (76.2%)	12 (63.2%)	0.4945
	Negative	5 (23.8%)	7 (36.8%)	
Local recurrence	Positive	4 (19.0%)	2 (10.5%)	0.6642
	Negative	17 (81.0%)	17 (89.5%)	

SF, surgery first; CF, chemotherapy first; CAP, College of American Pathologists;

N. A., not available.

【結果】

1) 術前未治療膵癌における CAF マーカの発現

第一の検討として行った TMA の解析では、全ての TMA 症例において間質における palladin、 α -SMA、podoplanin の発現を評価し、結果を Table 4 に示し、また、代表的な組織所見を Figure 2 に示した。palladin で染色される間質細胞は腫瘍細胞の近傍に、腫瘍細胞・胞巣を縁取るように分布しており、podoplanin も腫瘍細胞近傍を中心に染色されるが palladin より広範囲に分布していた。 α -SMA は腫瘍細胞との距離に関係なく、ほぼ間質全域に非特異的な染色性を示した。腫瘍細胞自体の染色像は、いずれの抗体でも認められなかった。間質における各マーカの発現陽性率であるが、膵癌内部の間質では palladin は 70 例 (41.9%)、 α -SMA は全症例 (100%)、podoplanin は 131 例 (78.4%) で陽性となった。一方、膵癌領域外の膵実質において palladin 陽性となったのは 8 例 (4.8%) のみであったが、 α -SMA は腫瘍外部の膵実質においても 164 例 (98.2%) と大多数が陽性となり、podoplanin は 38 例 (22.8%) に陽性であった。

Table 4. 腫瘍内外の間質における各 CAF マーカの発現頻度

Stromal expression		n (%)	
		Inside of the tumor	Outside of the tumor
palladin	Positive	70 (41.9%)	8 (4.8%)
	Negative	97 (58.1%)	159 (95.2%)
α -SMA	Positive	167 (100.0%)	164 (98.2%)
	Negative	0	3 (1.8%)
podoplanin	Positive	131 (78.4%)	38 (22.8%)
	Negative	36 (21.6%)	129 (77.2%)

α -SMA, α -smooth muscle actin.

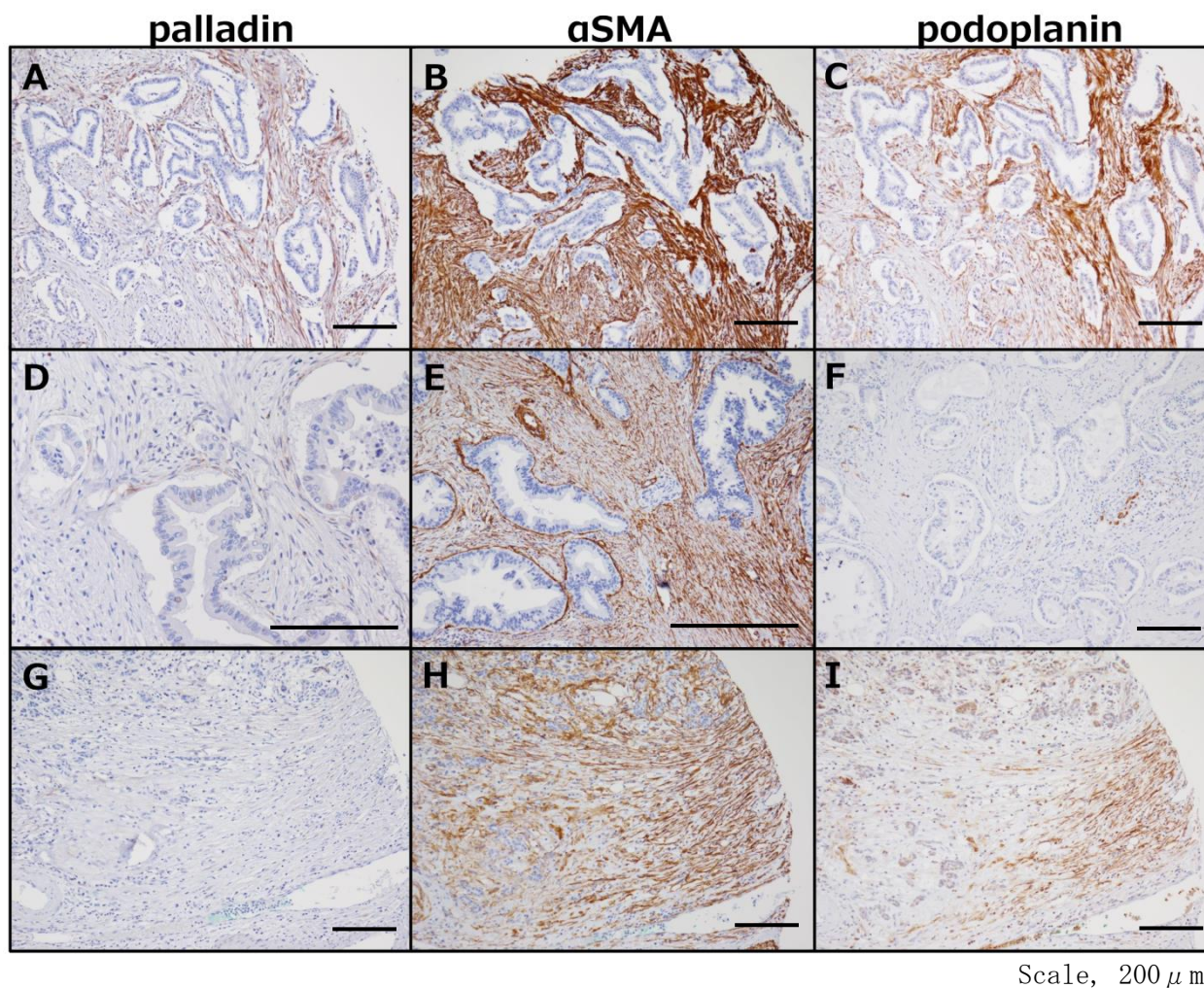


Figure 2. palladin、 α -SMA、podoplanin の代表的な免疫組織化学染色所見

A-C、D-F、G-I がそれぞれ同一コアの像である。

A: palladin で染色される間質細胞は主に腫瘍細胞の近傍に分布しているが、腫瘍細胞には有意な染色性は認められない。 B: α -SMA は多くのコアで間質に瀰漫性に染色性を示す。 C: podoplanin で染色される間質細胞の分布は palladin に類似しているが範囲はより広域である。 D: palladin で染色される間質細胞が腫瘍胞巣の極近傍のみに認められるが、比率が 30%未満であり“陰性”と判定した。 E: α -SMA は瀰漫性に染色性が認められる。 F: podoplanin による染色性は認められず陰性と判定した。 G-I: 腫瘍外の脾実質では、 α -SMA、podoplanin は一部の症例で間質細胞に染色性が認められるが、palladin 陽性細胞はほとんど認められない。

2) CAF マーカーの発現と、その他臨床病理学的因子

palladin と podoplanin の陽性が有意に関連した以外は、他のマーカーの発現状況に関連は認められなかった。 palladin、podoplanin それぞれの発現の有無と臨床病理学的因子の関連を Table 5 に示すが、いずれの臨床病理学的因子とも関連がなかった（ α -SMA は陽性 100%、陰性 0%のため割愛する。）

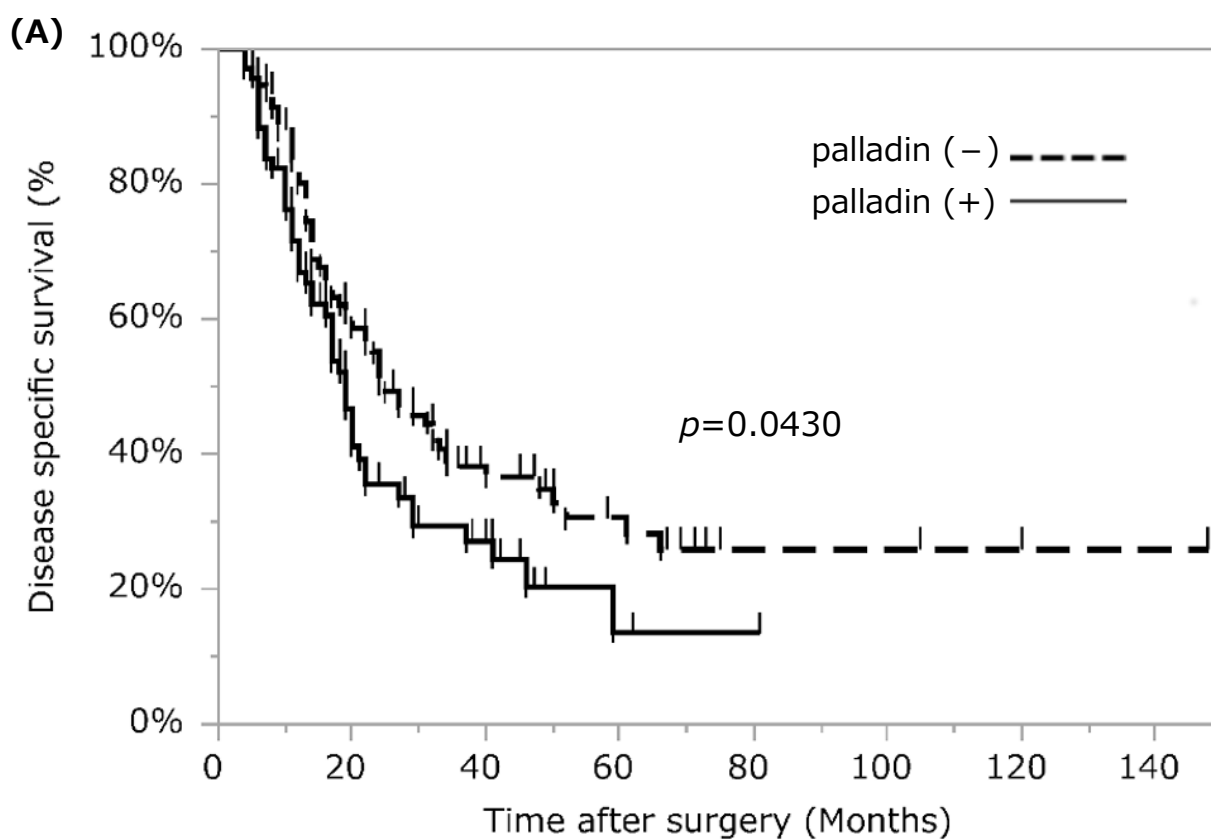
Table 5. 間質の palladin、podoplanin 発現とその他の臨床病理学的因子の関連

		Stromal palladin expression		Stromal podoplanin expression	
		positive (n=70) n (%), Mean (range)	p-value	positive (n=131) n (%), Mean (range)	p-value
Gender	Male (98)	53 (61.4%)	0.6331	77 (58.3%)	1.0000
	Female (69)	27 (38.6%)		54 (41.22%)	
Age, year		66 (43-83)	0.8647	66 (43-89)	0.9984
Tumor location	Head (98)	45 (64.3%)	0.2651	80 (61.1%)	0.2323
	Body + tail (69)	25 (35.7%)		51 (38.9%)	
Tumor size, cm		3.0 (1.2-8.0)	0.2630	3.0 (1.0-8.0)	0.2186
Histopathological grade	G1+2 (145)	59 (84.3%)	0.4887	114 (87.0%)	1.0000
	G3 (22)	11 (15.7%)		17 (13.0%)	
Surgical margin	Positive (26)	9 (12.9%)	0.6631	19 (12.9%)	1.0000
pT	1+2 (7)	4 (5.7%)	0.4543	7 (5.3%)	0.3481
	3+4 (160)	66 (94.3%)		124 (94.7%)	
Regional lymph node metastasis	Positive (117)	52 (74.3%)	0.3922	89 (77.8%)	0.3075
Distant metastasis	Positive (11)	5 (7.1%)	1.0000	8 (6.1%)	0.7046
Pathological stage	I A-II A (47)	16 (22.9%)	0.2248	40 (30.5%)	0.2157
	II B-IV (120)	54 (77.1%)		91 (69.5%)	
Lymphatic invasion	Positive (109)	48 (68.6%)	0.5112	86 (65.7%)	0.8456
Vascular invasion	Positive (138)	60 (85.7%)	0.4139	106 (80.9%)	0.3275
Perineural invasion	Positive (147)	64 (91.4%)	0.3355	114 (87.0%)	0.5710
Recurrent disease	Positive (125)	56 (80.0%)	0.4887	95 (73.1%)	0.2758
Local recurrence	Positive (29)	12 (17.1%)	1.0000	23 (17.8%)	1.0000
Stromal podoplanin expression	Positive (70)			64 (48.9%)	<u>0.0005</u>
Stromal α -SMA expression	Positive (167)	70 (100.0%)	N.A.	131 (100.0%)	N.A.
Stromal podoplanin expression	Positive (131)	64 (91.4%)	<u>0.0005</u>		

 α -SMA, α -smooth muscle actin; N.A., not available.

3) CAF マーカーの発現と生存期間の関連

TMA 症例全体での 5 年疾患特異的生存率 (DSS) は 23.1%であり、5 年無再発生存率 (DFS) は 16.8%であった。DSS、DFS と臨床病理学的因子、および各マーカーとの関係を Table 6 に示した。palladin の発現は DSS ($p=0.0430$)、DFS ($p=0.0315$) の双方で有意な予後不良因子であったが (Figure 3)、 α -SMA、podoplanin の陽性は予後への寄与は認められなかった。単変量で有意だった因子を用いた多変量解析を行ったところ、palladin 陽性は DSS (HR, 1.60; $p=0.0243$)、DFS (HR, 1.59; $p=0.0131$) の双方で独立した予後因子として抽出された (Table 7, 8)。その他の予後因子は Table 5 の記載の通りである。



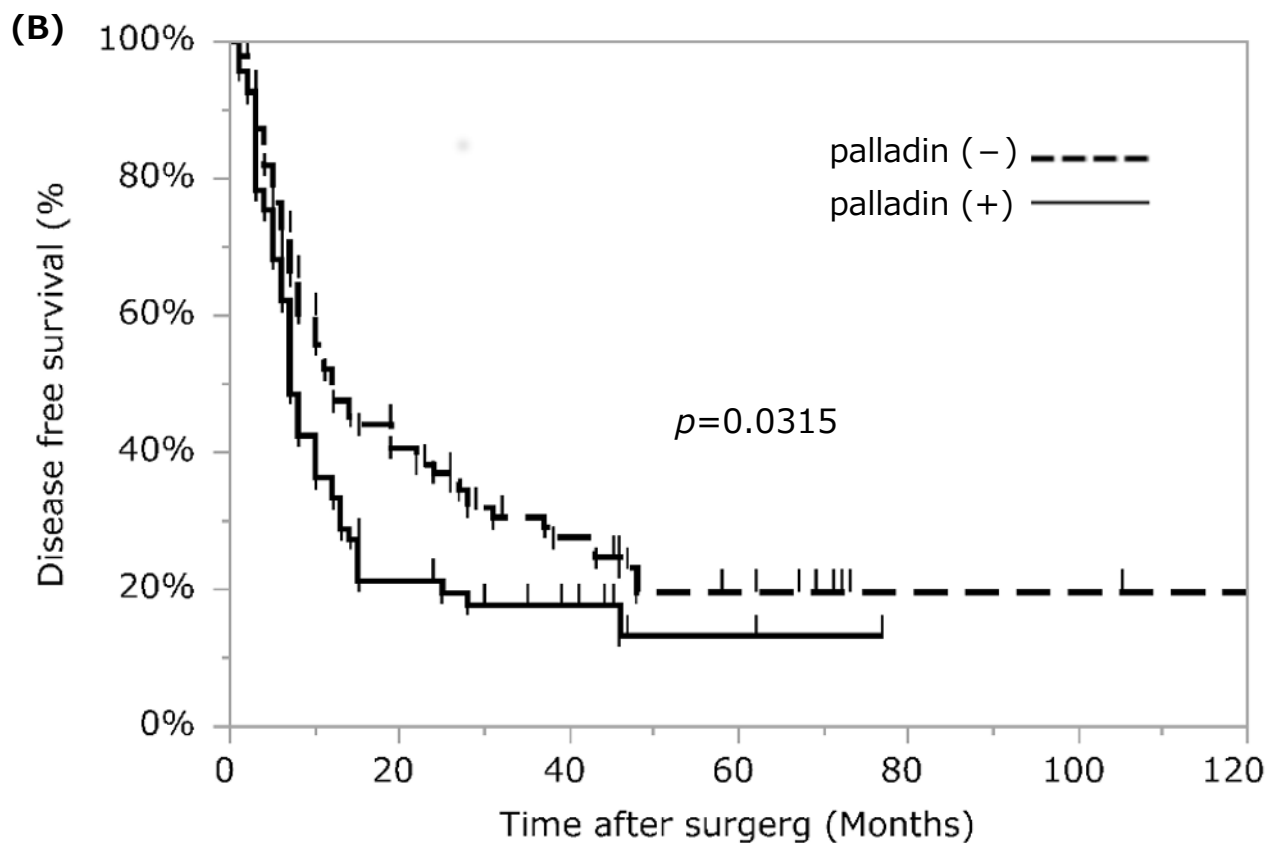


Figure 3. palladin 発現の有無による膵癌患者の生存解析

(A) 疾患特異的生存率(DSS)、(B) 無再発生存率(DFS)。(B)では2例で再発に関する情報が得られず解析から除外した。膵癌間質における palladin 発現陽性群と陰性群では、疾患特異的生存、無再発生存の双方で有意に発現陽性群が予後不良であった。

Table 6. 臨床病理学的因子と 5 年疾患特異的生存 (DSS)、5 年無再発生存 (DFS) の関連

		N	5year DSS (%)	p-value	5year DFS (%)	p-value
Gender	Male	98	15.1	<u>0.0210</u>	8.8	0.0552
	Female	69	35.2		25.4	
Age	<67	84	23.0	0.2121	11.1	0.2665
	≥67	83	24.7		22.2	
Tumor location	Head	98	20.7	<u>0.0187</u>	17.4	0.4171
	Body + tail	69	30.6		17	
Tumor size	≤3.0cm	94	33.2	<u><0.0001</u>	26.5	<u><0.0001</u>
	>3.0cm	73	11.7		N.A.	
Histopathological grade	G1-2	145	27.5	<u>0.0051</u>	18	<u>0.0004</u>
	G3	22	5.4		5.5	
Surgical margin	Positive	24	23.9	<u>0.0116</u>	7.5	<u>0.0125</u>
	Negative	143	25.3		18.2	
pT	1+2	7	N.A.	0.9999	N.A.	0.3849
	3+4	160	25.8		17.1	
Regional lymph node metastasis	Positive	117	16.3	<u>0.0149</u>	8.2	<u>0.0003</u>
	Negative	50	38.6		34.2	
Distant metastasis	Positive	11	N.A.	0.2408	N.A.	0.5171
	Negative	156	24.1		17.1	
Pathological stage	IA-IIA	47	41.2	<u>0.0029</u>	36.4	<u><0.0001</u>
	IIB-IV	120	15.9		8	
Lymphatic invasion	Positive	109	15	<u>0.0006</u>	9	<u><0.0001</u>
	Negative	58	42.7		30	
Vascular invasion	Positive	138	22.3	0.0509	13.9	<u>0.0161</u>
	Negative	29	36.6		31.9	
Perineural invasion	Positive	147	20.4	<u>0.0048</u>	12.2	<u>0.0018</u>
	Negative	20	50.9		43.9	
Adjuvant chemotherapy	Yes	83	33.8	<u>0.0084</u>	18.1	0.1044
	No	83	18.3		14.4	
palladin expression	Positive	70	13.5	<u>0.0430</u>	13.2	<u>0.0315</u>
	Negative	97	30.6		16.7	
podoplanin expression	Positive	132	18	0.647	N.A.	0.1924
	Negative	35	26.2		19.6	

DSS, disease specific survival; DFS, disease free survival; N.A.. Not available.

Table 7. 5 年疾患特異的生存 (DSS) における独立予後因子

	Hazard Ratio	<i>p</i> -value	95% CI
Male	1.32	0.1757	0.88-2.00
Pancreas head tumor	1.65	<u>0.0201</u>	1.08-2.54
Tumor size (>3.0cm)	2.42	<u><0.0001</u>	1.58-3.69
Histopathological grade3	1.78	0.0547	0.99-3.07
Surgical margin positive	1.64	0.0805	0.94-2.72
Regional lymph node metastasis	4.17	0.0588	0.94-12.90
pStageIIB - IV	5.79	<u>0.0288</u>	1.24-19.67
Lymphatic invasion positive	1.46	0.0986	0.93-2.34
Perineural invasion positive	1.58	0.2195	0.77-3.68
No adjuvant chemotherapy	1.59	<u>0.0242</u>	1.06-2.39
palladin expression positive	1.60	<u>0.0243</u>	1.06-2.41

DSS, disease specific survival; CI, Confidence Interval.

Table 8. 5 年無再発生存 (DFS) における独立予後因子

	Hazard Ratio	<i>p</i> -value	95% CI
Tumor size (>3.0cm)	2.30	<u><0.0001</u>	1.57-3.34
Histopathological grade3	2.11	<u>0.0126</u>	1.18-3.54
Surgical margin positive	1.56	0.0858	0.93-2.50
pStageIIB - IV	1.78	0.4095	0.40-5.68
Lymphatic invasion positive	1.78	<u>0.0067</u>	1.17-2.78
Perineural invasion positive	1.39	0.3399	0.72-2.97
palladin expression positive	1.59	<u>0.0131</u>	1.10-2.28

DFS, disease free survival; CI, Confidence Interval.

4) 術前治療後膵癌検体における CAF マーカーの発現

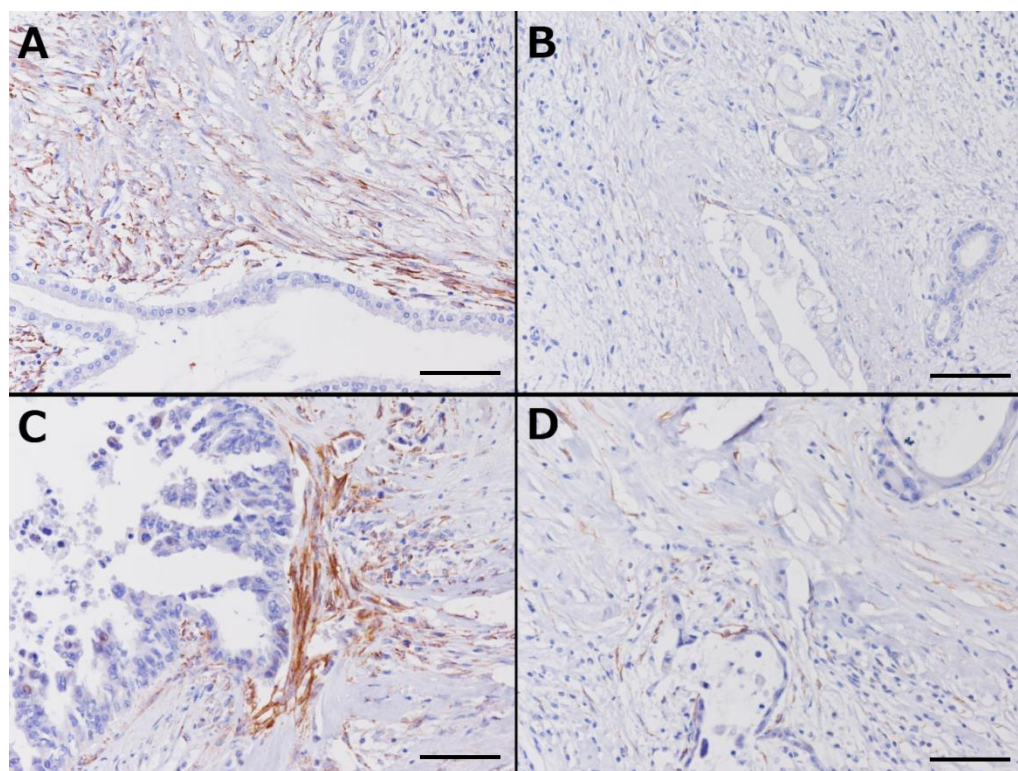
第二の検討として、SF 群 21 例、CF 群 19 例の whole section 切片を使用し、第一の検討と同様に免疫組織学的解析を行った。SF 群、CF 群の 2 群間に患者背景の差は認められなかった (Table 3)。CF 群の術前治療期間の中央値は 7 ヶ月 (2 ヶ月～44 ヶ月) であった。術前治療内容は、全身化学療法のための症例が 14 例でレジメンの内訳は、gemcitabine (GEM)、TS-1^{*}(テガフル、ギメラシル、オテラシルカリウム合剤) 併用療法 7 例のうち 1 例が GEM 単独へレジメン変更となった。GEM 単独が 5 例のうち 1 例が TS-1^{*}単剤へ変更された。TS-1^{*}単独が 1 例であった。化学放射線療法は 3 例で施行されており、化学療法レジメンは GEM、TS-1^{*}併用が 2 例、GEM および 5-fluorouracil の併用が 1 例であった。2 例で動脈内注入化学療法が行われ、2 例とも GEM の全身投与と 5-fluorouracil との併用であった。

SF、CF 各群における各 CAF マーカーの陽性頻度を Table 9 に示す。palladin 陽性は SF 群で 16 例 (76.2%)、CF 群では 5 例 (26.3%) と、CF 群で有意に頻度が低く ($p=0.0037$)、 α -SMA 陽性も SF 群で有意に多く認められた ($p=0.0177$)。一方、podoplanin 陽性は SF、CF 群間で水準の差は認められなかった ($p=0.3140$)。Figure 4 に CF 群における代表的な palladin 免疫染色像を示す。palladin で染色される間質細胞が認められるのは腫瘍細胞のごく近傍で未治療症例よりもさらに限局化しており、染色強度も弱かった。また、明らかに変性を来している腫瘍細胞の周囲で認められる間質細胞は、さらに染色が微弱になっていた。病理学的な治療効果判定は Evans 分類、CAP 分類に基づいて行ったが、どちらも palladin の陽性・陰性とは関連しなかった (Table 10, 11)。生存解析では、疾患特異生存において、SF 群で 5 年生存率 28.7%、CF 群で 59.4%と有意差が認められた ($p=0.0144$)。CF 群のサブグループ解析では、組織学的治療効果判定や α -SMA、podoplanin の発現は予後と関連しなかったものの、palladin 陽性例では有意に術後の疾患特異生存期間が短縮していた ($p=0.0190$) (Figure 5)。

Table 9. 化学療法未施行・化学療法後膵癌症例における間質の CAF マーカー発現

		SF group (n=21) n (%)	CF group (n=19) n (%)	p-value
palladin	Positive	16 (76.2%)	5 (26.3%)	<u>0.0037</u>
	Negative	5 (23.8%)	14 (73.7%)	
α -SMA	Positive	21 (100.0%)	14 (73.7%)	<u>0.0177</u>
	Negative	0	5 (26.3%)	
podoplanin	Positive	16 (76.2%)	11 (57.9%)	0.3140
	Negative	5 (23.8%)	8 (42.1%)	

SF, surgery first; CF, chemotherapy first.



Scale; 100 μ m

Figure 4. 化学療法後症例における palladin 染色像

A、B は同一症例の異なる部位、C、D はそれぞれ別症例である。palladin が陽性となる症例でも、変性した腫瘍細胞の周囲では染色される領域・強度が他部位より低下している (B、D)。

Table 10. palladin の発現と Evans 分類の関連

Treatment effect	The Evans grading	Stromal palladin expression		<i>p</i> -value
		Positive (n=5)	Negative (n=14)	
Low	I	2 (40%)	2 (14%)	0.1060
	IIa	3 (60%)	5 (36%)	
High	IIb	0	4 (29%)	
	III	0	0	
	IV	0	3 (21%)	

Table 11. palladin の発現と CAP 分類の関連

Treatment effect	The CAP grading	Stromal palladin expression		<i>p</i> -value
		Positive (n=5)	Negative (n=14)	
Low	3	3 (60%)	2 (14%)	0.5304
	2	2 (40%)	8 (57%)	
High	1	0	1 (7%)	
	0	0	3 (22%)	

CAP, Colleague of American Pathologists.

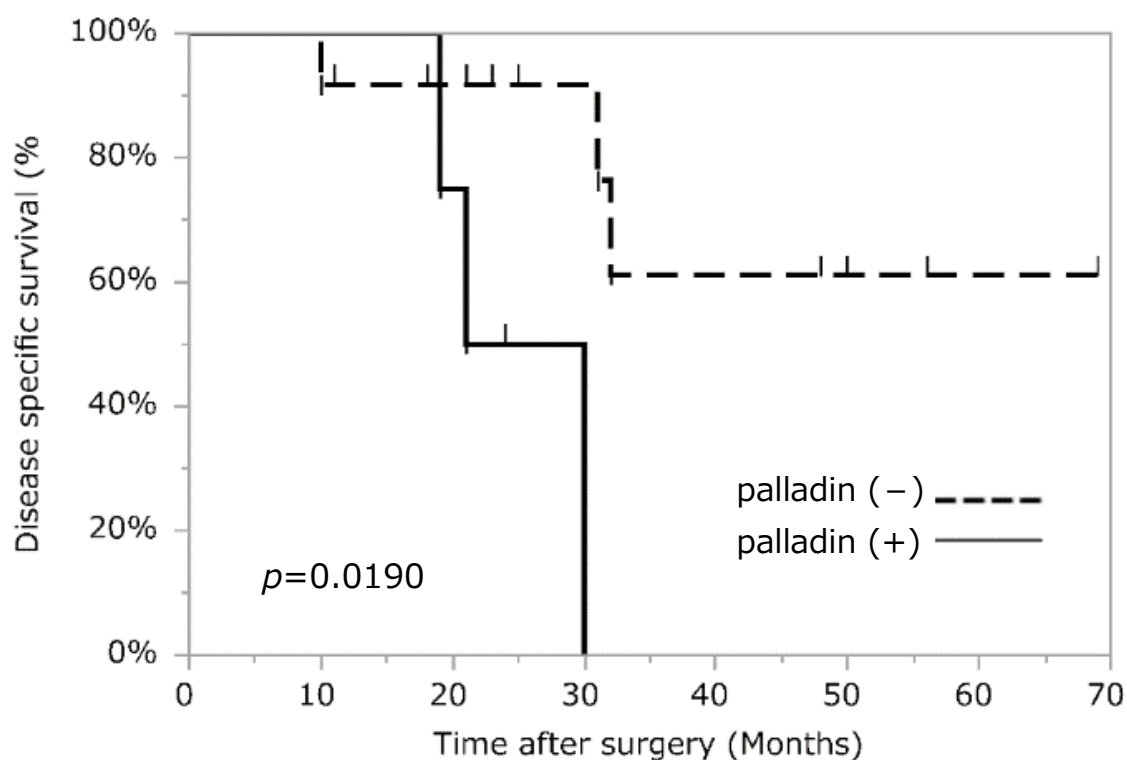


Figure 5. 化学療法後膀胱癌における間質の palladin 発現の有無による疾患特異的生存解析
 化学療法後膀胱癌において、膀胱癌間質における palladin 発現陽性群と陰性群では、発現陽性群で有意に疾患特異的生存が短縮していた。

5) 切断断端における palladin 陽性細胞と局所再発の関連

SF 群で 4 例 (19%)、CF 群で 1 例 (5%) の 2 群で計 5 例 (13%) において palladin で染色される間質細胞が検体の断端に露出していた。そのうち 3 例 (60.0%) で局所再発をきたしており、断端に palladin 陽性細胞の露出がない 35 例における局所再発 3 例 (8.6%) に比較して有意に高率であった ($p=0.0178$) (Table 12)。

Table 12. 局所再発症例における palladin 陽性細胞の断端露出の割合

		Exposure of palladin expressing stromal cells on the margin		<i>p</i> -value
		Positive (n=5)	Negative (n=35)	
Local recurrence	Positive	3 (60.0%)	3 (8.6%)	0.0178
	Negative	2 (40.0%)	32 (91.4%)	

【考察】

癌の組織は腫瘍細胞のみから成るわけではなく、線維芽細胞、炎症細胞、免疫細胞、血管構成細胞や細胞外器質など多数の要素により構成されているが、これまで癌に対する研究者の解析対象は癌細胞そのものに大きく偏っており、必然的に切除検体から得られる予後因子も病期、腫瘍（癌細胞）浸潤や遺残の有無など、癌細胞に関連した項目のみに限られていった。しかし近年、腫瘍微小環境（TME）の解析が進み、癌の発育・進展において宿主免疫細胞、間質細胞などの周囲細胞が細胞間接触や傍分泌機構により、互いに保持・活性化し合っており⁴²、それらの癌細胞以外の細胞の存在・活性化状態も担癌患者の予後に影響を及ぼしていることが明らかになってきた。

腫瘍間質の構成細胞の中でも CAF は主要な要素の一つであり、腫瘍細胞の生存維持、腫瘍細胞浸潤・転移を促進し、血管新生、免疫反応の制御といった機能を持つとされている^{27, 28}。さらに、CAF はその多寡が患者の予後不良因子となると考えられており⁴³、微小環境の解析対象として、あるいは将来的な治療ターゲットとして特に注目を集めている^{29, 30, 44}。膵癌は豊富な間質を有するため、CAF の含有も多いと考えられており、CAF 研究の対象として膵癌臨床検体や膵癌細胞株がしばしば用いられている^{32, 43, 45, 46}。

CAF が発現しているタンパクは多数あり、 α -SMA、vimentin、fibroblast-specific protein 1、fibroblast activation protein、podoplanin、palladin などが知られている⁴⁷⁻⁵⁰。免疫組織学的研究においてはそれぞれの状況で適したいずれかのマーカーの発現が、CAF の定義として用いられている。しかし、それぞれのマーカーで識別される細胞集団が必ずしも同一ではないことには注意が必要である。CAF の起源は複数想定されており、既存組織内の線維芽細胞の活性化⁵¹、骨髄由来細胞の遊走⁵²、腫瘍細胞の EMT による変化⁵³、血管関連細胞からの分化⁵⁴などがある。そのため CAF は本来的に不均一な集団であり、腫瘍非関連の細胞との鑑別も含め、明確な定義・識別が難しい⁵⁵。さらに、近年は線維芽細胞の中にも腫瘍進展を抑制する方向に働く一群があることもわかってきており⁵⁶、各マーカーがそれぞれ CAF の異なった性質を反映しているのかもしれない。

現状において最も広く知られ、また汎用されている CAF マーカーは α -SMA であるが、 α -SMA は広く正常組織にも発現が認められる。免疫組織学的に CAF の発現を観察する今回の研究において、コントロールとしての α -SMA の観察は有用と思われたが、症例や組織の部位毎の差異を十分に観察できない可能性があった。そこで、今回は既知の CAF マーカーの中でも膵癌間質出の特異性が知られ、比較的新規性のある palladin に着目した。

palladin はアクチン関連蛋白の一種であり、当初は細胞骨格形成の足場として働く成分として見い出され、胎生期の細胞運動、細胞形態の維持には必須と考えられている。単一の palladin 遺伝子から分子量の異なる複数の変異体（50kDa、90kDa、140kDa、200kDa など）が形成され、それぞれ分布する組織毎に特異性をもって発現される^{57, 58}。膵癌において palladin が過剰発現することは以前から知られていたが⁵⁹、Salaria ら⁴⁷は免疫組織学的解

析と蛋白分析により、膵癌における palladin が腫瘍細胞よりも間質細胞を主として分布していることを明らかにし、palladin を膵癌 CAF マーカーとして位置づけた。

Salaria ら⁴⁷のデータは CAF における palladin の意義を検討する上で基礎となるものであるが、その報告では間質細胞でより強度の palladin 発現を認めたものの、一部症例では膵癌上皮細胞にも発現が認められるとしており、その点に関しては腫瘍細胞に有意ととれる染色性を見認めなかった今回の結果と異なっている。この腫瘍細胞における染色性の乖離は主に研究に使用された抗体の差異に基づくと思われる、のちに Goicoechea ら⁶⁰は Salaria ら⁴⁷と同様の palladin ポリクローナル抗体に加え、palladin モノクローナル抗体 (1E6) による免疫組織染色実験を行い、後者がより膵癌 CAF に対して特異的であること報告した。今回の検討では Goicoechea ら⁶⁰と同じモノクローナル抗体を使用した。上皮細胞における palladin 染色像は認められず、腫瘍内部の間質に対しては高い特異性を示した。一般に CAF マーカーとされている α -SMA、podoplanin においても上皮細胞の陽性は認められなかったが、palladin とは対照的に腫瘍外の間質へも反応しており、膵癌 CAF の組織マーカーとして palladin は特異性の面でより優れていると考えられた。

しかし、膵癌上皮細胞の palladin 染色性を単に CAF マーカーにおける”偽陽性”と捉えてよいのかは確定的ではない。CAF の起源の一つに上皮細胞からの EMT が知られており⁵³、palladin に関しても膵癌上皮細胞が形態変化し間葉系細胞の性質を獲得する過程で palladin が発現している可能性も考えられる。このように palladin と上皮間葉移行の関連は未知であり、今後、さらなる研究によって新たな知見が得られることが期待される。

腫瘍微小環境における palladin の機能に関して *in vitro* の系で多くの報告がなされているが、実臨床症例におけるその意義はこれまでほとんど検討されていなかった。現在まで、Brentnall ら⁶¹による palladin 遺伝子の導入による正常線維芽細胞活性化と随伴する腫瘍細胞の浸潤能増大の実験や、Goicoechea ら⁶²のマウスのゼノグラフトモデルによる CAF の palladin 発現レベルと膵癌の腫瘍増大・転移との関連を示した報告などがある。このように、palladin は膵癌の悪性度との関連を示唆する複数の報告があるにも関わらず、これまで、palladin は腎細胞癌において予後との関連が報告されているが³⁹、検索し得た限りでは、膵癌においてはその CAF への特異性にもかかわらず生存との関連性に対する解析は行われていない。

今回、TMA を用いた比較的大規模な患者検体研究において、膵癌における CAF の palladin 発現状況と臨床病理学的因子の関連を初めて解析し、palladin の発現が膵癌の独立した予後因子であることを証明した。患者予後における palladin の関与を証明したことは、過去の palladin の腫瘍進展におけるメカニズムを示した実験報告^{61, 62}を裏付けるという点と、腫瘍細胞に依存した膵癌予後因子と異なり間質細胞を観点とした因子であるという点で特に重要なものであると考える。

現在、膵癌の術前治療は目覚ましい進歩がみられ^{12, 15, 63, 64}、それに伴って術前治療後に

摘出した組織における治療効果の評価の重要性も高まっている。評価判定法は最も頻用されている Evans 分類をはじめ複数存在するが、それらは主に摘出した検体中に残存する腫瘍細胞が viable かどうかを判断し、その比率を算出することにより行われ、一部の分類では線維化の程度も評価対象となる^{18, 41, 65}。しかし、組織学的治療効果判定を用いた多くの研究で、効果の程度と予後の関連は必ずしも証明されてこなかった^{22, 66}。その原因として、以下の二つが考えられる。1) “viable” かどうかの判定基準が十分に定義されておらず、客観性を欠く点に問題がある。2) 膵癌で多く観察される線維化には、腫瘍進展に伴った線維化、治療後変化として生じた線維化、腫瘍・治療とは非関連の膵炎既往などによる背景組織の線維化などさまざまなものが混在しており、これらを見分ける指標が存在しなかった⁶⁵。特に2)に関しては、線維化を免疫組織学的観点からより客観的に定義できないか、ということが今回の研究を開始する動機の一つであったが、本研究では間質の定性的な分類まで踏み込んだ研究は行えなかった。

今回、免疫組織学的解析で palladin の発現が化学療法後に有意に低下することを初めて示すことができた。特に、変性した腫瘍細胞の周囲では palladin 陽性の間質細胞がほとんど認められないことが示され、治療効果の度合いによって palladin 発現の変化の程度も大きくなる可能性も示唆された。このように、Evans 分類や CAP 分類といった組織学的治療効果判定規準が予後との関連を示さない中、palladin の発現レベルは治療後に明確に変化し、その発現レベルが治療後症例における予後との関連性を示した。他の癌種における研究では、大腸癌・卵巣癌で化学療法後に CAF が増加したとする報告^{67, 68}など本研究と相反するものもあるが、CAF マーカーとして palladin を使用したものではない。化学療法後の膵癌を対象とした免疫組織学的研究は限られており、得られている知見はわずかである。特に、膵癌における化学療法後の CAF の変化や予後との関連は類似研究が無く、今後、異なる組織マーカーによる研究が必要である。本研究で示された、palladin の予後への影響と、palladin が他の癌細胞由来の予後因子と有意な関連を持たないという点からは、免疫組織学的に palladin の発現が低下することが、腫瘍細胞そのものへの変性効果とは異なった経路による抗腫瘍効果の一端を示している可能性が示唆される。

膵癌切除検体評価におけるもう一つの問題は、組織学的に腫瘍遺残が認められない症例の中にも局所再発が経験されることである。本研究の whole-section 検討では、6 例（SF 群 4 例、CF 群 2 例）が R0 評価にもかかわらずのちに局所再発を経験しているが、palladin 陽性の間質細胞が切離断端に露出していた症例では 5 例中 3 例（60.0%）と、露出のない症例と比較して（3/35、8.6%）有意に局所再発率が高かった（ $p=0.0178$ ）。

CAF が膵癌の発育を促進するという前提で今回の組織観察の結果を解釈すると、切離断端における CAF の残存が腫瘍再発の母地となりうるとの仮説を立てることができる。今回の TMA を用いた研究では palladin 発現レベルと局所再発の間に関連は認めなかったが、使用した TMA は腫瘍の辺縁部を意識的に sampling したわけではないため、検体切除断端におけ

る CAF の状態を反映したものではない。腫瘍切除後に遺残した CAF がどのような意義を有するかは未だ不明だが、切離断端における CAF の状態に注目した研究が今後必要と考えられる。この点が明らかになれば、化学療法などの治療後に出現した線維化巣、つまりかつて腫瘍が存在したが消退したと考えられる部位を、手術時に切除範囲に含めるべきかという臨床上の問題の解決に有用な情報をもたらすかもしれない。

本研究における化学療法後症例に関する検討は、膵癌術前治療最初期からの症例を対象としたため症例数が限られ、また、術前治療の内容も多岐に渡っているという問題がある。より多数例に対して追試を行った場合でも今回と同様の結果が再現されるかどうか、また化学療法薬の種類および投与法の違いや、放射線照射の付加の有無、治療期間の長短により CAF の変化の程度が影響を受けるかどうかなど、今後、切除検体における CAF の状態を予後因子として臨床利用していくためには多くの検討が必要である。現在は膵癌術前治療に関する前向き臨床試験が複数行われており、それらの背景条件が均一な症例群を対象に検討を行うことで、より明確な結果が得られると考えられる。また、今回は化学療法後の膵癌検体を、術前未治療の症例群と比較したが、CAF の変化という観点で考えるならば、同一症例の治療前後を比較検討すべきである。近年の膵癌手術症例では EUS-FNA (Endoscopic Ultrasound-Fine Needle Aspiration) による組織診断がほぼ全例で行われており、比較検討は可能である。間質の観察という点で、果たして少量の EUS-FNA の検体が適するかどうかという問題はあるものの、より精密な比較が可能であると考えられる。

【総括および結論】

本研究では、膵癌臨床切除検体の TMA を用いた術前未治療症例における CAF の免疫組織学的検討と、whole section を用いた術前治療例、未治療例の免疫組織学的手法による CAF の比較を行い、以下の知見が得られた。

- ・膵癌切除検体における CAF マーカーの発現状況を TMA を用いた多数例で解析し、膵癌間質において palladin、 α -SMA、podoplanin それぞれが陽性となる細胞を認めた。
- ・palladin 陽性の間質細胞は腫瘍近傍に限局する特徴的な分布を示した。
- ・膵癌間質における palladin の発現は、独立した予後不良因子であった。
- ・化学療法後の膵癌組織における CAF マーカーの発現状況を解析し、術前未治療症例と比較して陽性頻度の低下を認めた。
- ・化学療法施行後の症例においても palladin 陽性は単変量解析で予後不良因子であった。

以上の結果から、膵癌間質の palladin 発現の有無は、膵癌術後患者の予後予測およびその後の治療・観察計画において有益な情報となる可能性がある。また、CAF に対する研究、特に化学療法によりもたらされる影響がより明確になれば、今後、より正確な膵癌術前治療後の効果判定法を確立できる可能性がある。

【謝辞】

稿を終えるにあたり、本研究の機会を与えて頂いた、北海道大学医学研究院 消化器外科学教室Ⅱ 平野 聡 教授、ならびに医学研究院 分子診断病理学教室 松野吉宏 教授に深く感謝致します。

また、本研究において直接ご指導頂いた北海道大学医学研究院 消化器外科学教室Ⅱ 土川 貴裕 講師、医学研究 分子診断病理学教室 三橋智子 准教授、ならびに北海道大学病院 コンパニオン診断研究部門 畑中 豊 特任講師に心から感謝申し上げます。

最後に、本研究を支えてくださった、消化器外科学教室Ⅱ、分子診断病理学教室、ならびに病理診断科・病理部の全ての皆様に心より御礼を申し上げます。

【引用文献】

1. Siegel R.L., Miller K.D., Jemal A. Cancer statistics, 2016. *CA Cancer J Clin.* 66, 7-30 (2016).
2. Rahib, L., Smith, B.D., Aizenberg, R., Rosenzweig, A.B., Fleshman, J.M., Matrisian, L.M. Projecting cancer incidence and deaths to 2030: the unexpected burden of thyroid, liver, and pancreas cancers in the United States. *Cancer Res.* 74, 2913-2921 (2014).
3. 江川 新一, 当間 宏樹, 大東 弘明, 奥坂 拓志, 中尾 昭公, 羽鳥 隆, 真口 宏介, 柳澤 昭夫, 田中 雅夫. 膵癌登録報告 2007 ダイジェスト. *膵臓*. 23, 105-123 (2008).
4. Ansari, D., Chen, B.C., Dong, L., Zhou, M.T., & Andersson, R. Pancreatic cancer: translational research aspects and clinical implications. *World J. Gastroenterol.* 18, 1417-1424 (2012).
5. Burris, H.A. 3rd, Moore, M.J., Andersen, J., Green, M.R., Rothenberg, M.L., Modiano, M.R., Cripps, M.C., Portenoy, R.K., Storniolo, A.M., Tarassoff, P., Nelson, R., Dorr, F.A., Stephens, C.D., Von Hoff, D.D. Improvements in survival and clinical benefit with gemcitabine as first-line therapy for patients with advanced pancreas cancer: a randomized trial. *J. Clin. Oncol.* 15, 2403-2413 (1997).
6. Ueno, H., Ioka, T., Ikeda, M., Ohkawa, S., Yanagimoto, H., Boku, N., Fukutomi, A., Sugimori, K., Baba, H., Yamao, K., Shimamura, T., Sho, M., Kitano, M., Cheng, A.L., Mizumoto, K., Chen, J.S., Furuse, J., Funakoshi, A., Hatori, T., Yamaguchi, T., Egawa, S., Sato, A., Ohashi, Y., Okusaka, T., & Tanaka, M. Randomized phase III study of gemcitabine plus S-1, S-1 alone, or gemcitabine alone in patients with locally advanced and metastatic pancreatic cancer in Japan and Taiwan: GEST study. *J. Clin. Oncol.* 31, 1640-1648 (2013).
7. Uesaka, K., Boku, N., Fukutomi, A., Okamura, Y., Konishi, M., Matsumoto, I., Kaneoka, Y., Shimizu, Y., Nakamori, S., Sakamoto, H., Morinaga, S., Kainuma, O., Imai, K., Sata, N., Hishinuma, S., Ojima, H., Yamaguchi, R., Hirano, S., Sudo, T., & Ohashi, Y; JASPAC 01 Study Group. Adjuvant chemotherapy of S-1 versus gemcitabine for resected pancreatic cancer: a phase 3, open-label, randomised, non-inferiority trial (JASPAC 01). *Lancet.* 388, 248-257 (2016).
8. Conroy, T., Paillot, B., François, E., Bugat, R., Jacob, J.H., Stein, U., Nasca, S., Metges, J.P., Rixe, O., Michel, P., Magherini, E., Hua, A., & Deplanque, G. Irinotecan plus oxaliplatin and leucovorin-modulated fluorouracil in advanced pancreatic cancer--a Groupe Tumeurs Digestives of the Federation Nationale des Centres de Lutte Contre le Cancer study. *J. Clin. Oncol.* 23, 1228-1236 (2005).

9. Von Hoff, D.D., Ervin, T., Arena, F.P., Chiorean, E.G., Infante, J., Moore, M., Seay, T., Tjulandin, S.A., Ma, W.W., Saleh, M.N., Harris, M., Reni, M., Dowden, S., Laheru, D., Bahary, N., Ramanathan, R.K., Tabernero, J., Hidalgo, M., Goldstein, D., Van Cutsem, E., Wei, X., Iglesias, J., Renschler, M.F. Increased survival in pancreatic cancer with nab-paclitaxel plus gemcitabine. *N. Engl. J. Med.* 369, 1691-1703 (2013).
10. Neoptolemos, J.P., Stocken, D.D., Friess, H., Bassi, C., Dunn, J.A., Hickey, H., Beger, H., Fernandez-Cruz, L., Dervenis, C., Lacaine, F., Falconi, M., Pederzoli, P., Pap, A., Spooner, D., Kerr, D.J., Büchler, M.W.; European Study Group for Pancreatic Cancer. A randomized trial of chemoradiotherapy and chemotherapy after resection of pancreatic cancer. *N. Engl. J. Med.* 350, 1200-10 (2004).
11. Ueno, H., Kosuge, T., Matsuyama, Y., Yamamoto, J., Nakao, A., Egawa, S., Doi, R., Monden, M., Hatori, T., Tanaka, M., Shimada, M., Kanemitsu, K. A randomised phase III trial comparing gemcitabine with surgery-only in patients with resected pancreatic cancer: Japanese Study Group of Adjuvant Therapy for Pancreatic Cancer. *Br. J. Cancer.* 101, 908-915 (2009).
12. Greer, S.E., Pipas, J.M., Sutton, J.E., Zaki, B.I., Tsapakos, M., Colacchio, T.A., Gibson, J.J., Wiener, D.C., Ripple, G.H., & Barth, R.J. Jr. Effect of neoadjuvant therapy on local recurrence after resection of pancreatic adenocarcinoma. *J. Am. Coll. Surg.* 206, 451-457 (2008).
13. Ferrone, C.R., Marchegiani, G., Hong, T.S., Ryan, D.P., Deshpande, V., McDonnell, E.I., Sabbatino, F., Santos, D.D., Allen, J.N., Blaszkowsky, L.S., Clark, J.W., Faris, J.E., Goyal, L., Kwak, E.L., Murphy, J.E., Ting, D.T., Wo, J.Y., Zhu, A.X., Warshaw, A.L., Lillemoe, K.D., Fernández-del, Castillo, C. Radiological and surgical implications of neoadjuvant treatment with FOLFIRINOX for locally advanced and borderline resectable pancreatic cancer. *Ann. Surg.* 261, 12-17 (2015).
14. Golcher, H., Brunner, T.B., Witzigmann, H., Marti, L., Bechstein, W.O., Bruns, C., Jungnickel, H., Schreiber, S., Grabenbauer, G.G., Meyer, T., Merkel, S., Fietkau, R., Hohenberger, W. Neoadjuvant chemoradiation therapy with gemcitabine/cisplatin and surgery versus immediate surgery in resectable pancreatic cancer: results of the first prospective randomized phase II trial. *Strahlenther Onkol.* 191, 7-16 (2015).
15. Satoi, S., Yamaue, H., Kato, K., Takahashi, S., Hirono, S., Takeda, S., Eguchi, H., Sho, M., Wada, K., Shintani, H., Kwon, A.H., Hirano, S., Kinoshita, T., Nakao,

- A., Nagano, H., Nakajima, Y., Sano, K., Miyazaki, M., & Takada, T. Role of adjuvant surgery for patients with initially unresectable pancreatic cancer with a long-term favorable response to non-surgical anti-cancer treatments: results of a project study for pancreatic surgery by the Japanese Society of Hepato-Biliary-Pancreatic Surgery. *J. Hepatobiliary Pancreat. Sci.* 20, 590-600 (2013).
16. Shimosato, Y., Oboshi, S., Baba, K. Histological evaluation of effects of radiotherapy and chemotherapy for carcinomas. *Jpn. J. Clin. Oncol.* 1, 19-35 (1971).
 17. Ishikawa, O., Ohhigashi, H., Teshima, T., Chatani, M., Inoue, T., Tanaka, S., Kitamura, T., Wada, A., Sasaki, Y., Imaoka, S., Iwanaga, T. Clinical and histopathological appraisal of preoperative for adenocarcinoma of the pancreatoduodenal region. *J. Surg. Oncol.* 40, 143-151 (1989).
 18. Evans, D.B., Rich, T.A., Byrd, D.R., Cleary, K.R., Connelly, J.H., Levin, B., Charnsangavej, C., Fenoglio, C.J., & Ames, F.C. Preoperative chemoradiation and pancreaticoduodenectomy for adenocarcinoma of the pancreas. *Arch. Surg.* 127, 1335-1339 (1992).
 19. 日本膵臓学会編. 膵癌取扱い規約. 第7版. 金原出版, 2016.
 20. Chun, Y.S., Cooper, H.S., Cohen, S.J., Konski, A., Burtness, B., Denlinger, C.S., Astsaturon, I., Hall, M.J., Hoffman, J.P. Significance of pathologic response to preoperative therapy in pancreatic cancer. *Ann. Surg. Oncol.* 18, 3601-3607 (2011).
 21. White, R.R., Xie, H.B., Gottfried, M.R., Czito, B.G., Hurwitz, H.I., Morse, M.A., Blobe, G.C., Paulson, E.K., Baillie, J., Branch, M.S., Jowell, P.S., Clary, B.M., Pappas, T.N., & Tyler, D.S. Significance of histological response to preoperative chemoradiotherapy for pancreatic cancer. *Ann. Surg. Oncol.* 12, 214-221 (2005).
 22. Zhao, Q., Rashid, A., Gong, Y., Katz, M.H., Lee, J.E., Wolf, R., Balachandran, A., Varadhachary, G.R., Pisters, P.W., Wang, H., Gomez, H.F., Abbruzzese, J.L., Fleming, J.B., & Wang, H. Pathologic complete response to neoadjuvant therapy in patients with pancreatic ductal adenocarcinoma is associated with a better prognosis. *Ann. Diagn. Pathol.* 16, 29-37 (2012).
 23. Yauch, R.L., Gould, S.E., Scales, S.J., Tang, T., Tian, H., Ahn, C.P., Marshall, D., Januario, T., Kallop, D., Nannini-Pepe, M., Kotkow, K., Marsters, J.C., Rubin, L.L., de Sauvage, F.J. A paracrine requirement for hedgehog signalling in cancer. *Nature.* 455, 406-410 (2008).
 24. Bailey, J.M., Swanson, B.J., Hamada, T., Eggers, J.P., Singh, P.K., Caffery, T., Ouellette, M.M., Hollingsworth, M.A. Sonic hedgehog promotes desmoplasia in

- pancreatic cancer. *Clin. Cancer Res.* 14, 5995-6004 (2008).
25. Apte, M.V., Haber, P.S., Darby, S.J., Rodgers, S.C., McCaughan, G.W., Korsten, M.A., Pirola, R.C., Wilson, J.S. Pancreatic stellate cells are activated by proinflammatory cytokines: implications for pancreatic fibrogenesis. *Gut.* 44, 534-541 (1999).
 26. Mews, P., Phillips, P., Fahmy, R., Korsten, M., Pirola, R., Wilson, J., Apte, M. Pancreatic stellate cells respond to inflammatory cytokines: potential role in chronic pancreatitis. *Gut.* 50, 535-541 (2002).
 27. Xing, F., Saidou, J., & Watabe, K. Cancer associated fibroblasts (CAFs) in tumor microenvironment. *Front Biosci (Landmark Ed).* 1, 166-79 (2010).
 28. Chiarugi, P. Cancer-associated fibroblasts and macrophages: Friendly conspirators for malignancy. *Oncoimmunology.* 2, e25563 (2013).
 29. Bhowmick, N.A., Neilson, E.G., & Moses, H.L. Stromal fibroblasts in cancer initiation and progression. *Nature.* 432, 332-337 (2004).
 30. Hwang, R.F., Moore, T., Arumugam, T., Ramachandran, V., Amos, K.D., Rivera, A., Ji, B., Evans, D.B., & Logsdon, C.D. Cancer-associated stromal fibroblasts promote pancreatic tumor progression. *Cancer Res.* 68, 918-926 (2008).
 31. von Ahrens, D., Bhagat, T.D., Nagrath, D., Maitra, A., Verma A. The role of stromal cancer-associated fibroblasts in pancreatic cancer. *J. Hematol. Oncol.* 10:76 (2017).
 32. Pietras, K., Ostman, A. Hallmarks of cancer: interactions with the tumor stroma. *Exp. Cell Res.* 316, 1324-1331 (2010).
 33. Choi, S.Y., Sung, R., Lee, S.J., Lee, T.G., Kim, N., Yoon, S.M., Lee, E.J., Chae, H.B., Youn, S.J., Park, S.M. Podoplanin, α -smooth muscle actin or S100A4 expressing cancer-associated fibroblasts are associated with different prognosis in colorectal cancers. *J. Korean. Med. Sci.* 28, 1293-1301 (2013).
 34. Paulsson, J., Micke, P. Prognostic relevance of cancer-associated fibroblasts in human cancer. *Semin. Cancer Biol.* 25, 61-68 (2004).
 35. Togo, S., Polanska, U.M., Horimoto, Y., Orimo, A. Carcinoma-associated fibroblasts are a promising therapeutic target. *Cancers (Basel).* 5, 149-169 (2013)
 36. Sherman M.H., Yu R.T., Engle D.D., Ding N., Atkins A.R., Tiriac H., Collisson E.A., Connor F., Van Dyke T., Kozlov S., Martin P., Tseng, T.W., Dawson, D.W., Donahue, T.R., Masamune, A., Shimosegawa, T., Apte, M.V., Wilson, J.S., Ng, B., Lau, S.L., Gunton, J.E., Wahl, G.M., Hunter T., Drebin, J.A., O'Dwyer P.J., Liddle C., Tuveson D.A., Downes M., Evans R.M. Vitamin D receptor-mediated stromal reprogramming

- suppresses pancreatitis and enhances pancreatic cancer therapy. *Cell*. 159, 80–93 (2014).
37. Salaria, S.N., Illei, P., Sharma, R., Walter, K.M., Klein, A.P., Eshleman, J.R., Maitra, A., Schulick, R., Winter, J., Ouellette, M.M., Goggins, M., & Hruban, R. Palladin is overexpressed in the non-neoplastic stroma of infiltrating ductal adenocarcinomas of the pancreas, but is only rarely overexpressed in neoplastic cells. *Cancer Biol. Ther.* 6, 324–8 (2007).
 38. Brentnall, T.A., Lai, L.A., Coleman, J., Bronner, M.P., Pan, S., & Chen, R. Arousal of cancer-associated stroma: overexpression of palladin activates fibroblasts to promote tumor invasion. *PLoS One*. 7, e30219 (2012).
 39. Gupta, V., Bassi, D.E., Simons, J.D., Devarajan, K., Al-Saleem, T., Uzzo, R.G., & Cukierman, E. Elevated expression of stromal palladin predicts poor clinical outcome in renal cell carcinoma. *PLoS One*. 6, e21494 (2011).
 40. Sobin, L.H., Gospodarowicz, M.K., Wittekind, C.h., & editors. TNM Classification of Malignant Tumours, 7th edn. Wiley-Blackwell: Oxford, 2009.
 41. College of American Pathologists. Protocol for the examination of specimens removed from patients with carcinoma of the exocrine pancreas. Available: http://www.cap.org/web/home/resources/cancer-reporting-tools/cancer-protocol-templates?_adf.ctrl-state=1abt5bceyj_158&_afLoop=379940655689824#%40%3F_afLoop%3D379940655689824%26_adf.ctrl-state%3D1bv7a7ipwi_17 Accessed 3 November 2015.
 42. Liao, D., Luo, Y., Markowitz, D., Xiang, R., & Reisfeld, RA. Cancer associated fibroblasts promote tumor growth and metastasis by modulating the tumor immune microenvironment in a 4T1 murine breast cancer model. *PLoS One*. 4, e7965 (2009).
 43. Erkan, M., Michalski, C.W., Rieder, S., Reiser-Erkan, C., Abiatari, I., Kolb, A., Giese, N.A., Esposito, I., Friess, H., & Kleeff, J. The activated stroma index is a novel and independent prognostic marker in pancreatic ductal adenocarcinoma. *Clin. Gastroenterol. Hepatol.* 6, 1155–1161 (2008).
 44. Heinemann, V., Reni, M., Ychou, M., Richel, D.J., Macarulla, T., & Ducreux, M. Tumour-stroma interactions in pancreatic ductal adenocarcinoma: rationale and current evidence for new therapeutic strategies. *Cancer Treat Rev.* 40, 118–128 (2014).
 45. Neesse, A., Michl, P., Frese, K.K., Feig, C., Cook, N., Jacobetz, M.A., Lolkema, M.P., Buchholz, M., Olive, K.P., Gress, T.M., & Tuveson, D.A. Stromal biology and therapy in pancreatic cancer. *Gut*. 60, 861–8 (2011).

46. Shindo, K., Aishima, S., Ohuchida, K., Fujiwara, K., Fujino, M., Mizuuchi, Y., Hattori, M., Mizumoto, K., Tanaka, M., & Oda, Y. Podoplanin expression in cancer-associated fibroblasts enhances tumor progression of invasive ductal carcinoma of the pancreas. *Mol. Cancer*. 12, 168 (2013).
47. Salaria, S.N., Illei, P., Sharma, R., Walter, K.M., Klein, A.P., Eshleman, J.R., Maitra, A., Schulick, R., Winter, J., Ouellette, M.M., Goggins, M., & Hruban, R. Palladin is overexpressed in the non-neoplastic stroma of infiltrating ductal adenocarcinomas of the pancreas, but is only rarely overexpressed in neoplastic cells. *Cancer Biol. Ther.* 6, 324–8 (2007).
48. Kitano, H., Kageyama, S., Hewitt, S.M., Hayashi, R., Doki, Y., Ozaki, Y., Fujino, S., Takikita, M., Kubo, H., & Fukuoka, J. Podoplanin expression in cancerous stroma induces lymphangiogenesis and predicts lymphatic spread and patient survival. *Arch. Pathol. Lab. Med.* 134, 1520–1527 (2010).
49. Cheng, J.D., Dunbrack, R.L. Jr., Valianou, M., Rogatko, A., Alpaugh, R.K., & Weiner, L.M. Promotion of tumor growth by murine fibroblast activation protein, a serine protease, in an animal model. *Cancer Res.* 62, 4767–4772 (2002).
50. Sugimoto, H., Mundel, T.M., Kieran, M.W., & Kalluri, R. Identification of fibroblast heterogeneity in the tumor microenvironment. *Cancer Biol. Ther.* 5, 1640–1646 (2006).
51. Elkabets, M., Gifford, A.M., Scheel, C., Nilsson, B., Reinhardt, F., Bray, M.A., Carpenter, A.E., Jirstrom, K., Magnusson, K., Ebert, B.L., Pontén, F., Weinberg, R.A., McAllister, S.S. Human tumors instigate granulins-expressing hematopoietic cells that promote malignancy by activating stromal fibroblasts in mice. *J. Clin. Invest.* 121, 784–799 (2011).
52. Direkze, N.C., Hodiwalla-Dilke, K., Jeffery, R., Hunt, T., Poulson, R., Oukrif, D., Alison, M.R., Wright, N.A. Bone marrow contribution to tumor-associated myofibroblasts and fibroblasts. *Cancer Res.* 64, 8492–8495 (2004).
53. von Nandelstadh, P., Gucciardo, E., Lohi, J., Li, R., Sugiyama, N., Carpen, O., & Lehti, K. Actin-associated protein palladin promotes tumor cell invasion by linking extracellular matrix degradation to cell cytoskeleton. *Mol. Biol. Cell.* 25, 2556–2570 (2014).
54. Zeisberg, E.M., Potenta, S., Xie, L., Zeisberg, M., Kalluri, R. Discovery of endothelial to mesenchymal transition as a source for carcinoma-associated fibroblasts. *Cancer Res.* 67, 10123–10128 (2007).
55. Öhlund, D., Elyada, E., & Tuveson, D. Fibroblast heterogeneity in the cancer wound.

J. Exp. Med. 211, 1503–23 (2014).

56. Augsten, M. Cancer-associated fibroblasts as another polarized cell type of the tumor microenvironment. *Front Oncol.* 4, (2014).
57. Parast, M.M., Otey, C.A. Characterization of palladin, a novel protein localized to stress fibers and cell adhesions. *J. Cell Biol.* 150, 643–56 (2000).
58. Rönty, M.J., Leivonen, S.K., Hinz, B., Rachlin, A., Otey, C.A., Kähäri, V.M., & Carpén, O.M. Isoform-specific regulation of the actin-organizing protein palladin during TGF- β 1-induced myofibroblast differentiation. *J. Invest. Dermatol.* 126, 2387–2396 (2006).
59. Pogue-Geile, K.L., Chen, R., Bronner, M.P., Crnogorac-Jurcevic, T., Moyes, K.W., Downen, S., Otey, C.A., Crispin, D.A., George, R.D., Whitcomb, D.C., & Brentnall, T.A. Palladin mutation causes familial pancreatic cancer and suggests a new cancer mechanism. *PLoS Med.* 3, e516 (2006).
60. Goicoechea, S.M., Bednarski, B., Stack, C., Cowan, D.W., Volmar, K., Thorne, L., Cukierman, E., Rustgi, A.K., Brentnall, T., Hwang, R.F., McCulloch, C.A., Yeh, J.J., Bentrem, D.J., Hochwald, S.N., Hingorani, S.R., Kim, H.J., & Otey, C.A. Isoform-specific upregulation of palladin in human and murine pancreas tumors. *PLoS One.* 5, e10347 (2010).
61. Brentnall, T.A., Lai, L.A., Coleman, J., Bronner, M.P., Pan, S., & Chen, R. Arousal of cancer-associated stroma: overexpression of palladin activates fibroblasts to promote tumor invasion. *PLoS One.* 7, e30219 (2012).
62. Goicoechea, S.M., García-Mata, R., Staub, J., Valdivia, A., Sharek, L., McCulloch, C.G., Hwang, R.F., Urrutia, R., Yeh, J.J., Kim, H.J., & Otey, C.A. Palladin promotes invasion of pancreatic cancer cells by enhancing invadopodia formation in cancer-associated fibroblasts. *Oncogene.* 33, 1265–1273 (2014).
63. Motoi, F., Ishida, K., Fujishima, F., Ottomo, S., Oikawa, M., Okada, T., Shimamura, H., Takemura, S., Ono, F., Akada, M., Nakagawa, K., Katayose, Y., Egawa, S., & Unno, M. Neoadjuvant chemotherapy with gemcitabine and S-1 for resectable and borderline pancreatic ductal adenocarcinoma: results from a prospective multi-institutional phase 2 trial. *Ann. Surg. Oncol.* 20, 3794–3801 (2013).
64. Takeda, Y., Nakamori, S., Eguchi, H., Kobayashi, S., Marubashi, S., Tanemura, M., Konishi, K., Yoshioka, Y., Umeshita, K., Mori, M., Doki, Y., & Nagano, H. Neoadjuvant Gemcitabine-based Accelerated Hyperfractionation Chemoradiotherapy for Patients with Borderline Resectable Pancreatic Adenocarcinoma. *Jpn. J. Clin. Oncol.* 44, 1172–1180 (2014).

65. Hartman, D.J, Krasinskas, A.M. Assessing treatment effect in pancreatic cancer. *Arch. Pathol. Lab. Med.* 136, 100–109 (2012).
66. Chatterjee, D., Katz, M.H., Rashid, A., Varadhachary, G.R., Wolff, R.A., Wang, H., Lee, J.E., Pisters, P.W., Vauthey, J.N., Crane, C., Gomez, H.F., Abbruzzese, J.L., Fleming, J.B, & Wang, H. Histologic grading of the extent of residual carcinoma following neoadjuvant chemoradiation in pancreatic ductal adenocarcinoma: a predictor for patient outcome. *Cancer.* 118, 3182–3190 (2012).
67. Lotti, F., Jarrar, AM., Pai, R.K., Hitomi, M., Lathia, J., Mace, A., Gantt, G.A. Jr., Sukhdeo, K., DeVecchio, J., Vasanji, A., Leahy, P., Hjelmeland, A.B., Kalady, M.F., & Rich, J.N. Chemotherapy activates cancer-associated fibroblasts to maintain colorectal cancer-initiating cells by IL-17A. *J. Exp. Med.* 210, 2851–72 (2013).
68. Mhawech-Fauceglia, P., Wang, D., Samrao, D., Kim, G., Lawrenson, K., Meneses, T., Liu, S., Yessaian, A., & Pejovic, T. Clinical Implications of Marker Expression of Carcinoma-Associated Fibroblasts (CAFs) in Patients with Epithelial Ovarian Carcinoma After Treatment with Neoadjuvant Chemotherapy. *Cancer Microenviron.* 7, 33–39 (2014).